

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

31671 E/16 A96 B04 SASA/ 29.08.80
SASAKIT *J5 7042-632
29.08.80-JP-119313 (10.03.82) A61k-35/24 A61k-37/02

Double stranded DNA - D-glutaric acid-D-lysine copolymer adduct -
used for treating auto:immune diseases, esp. systemic lupus
erythematoses

Adduct of double-stranded DNA with D-glutamic acid-D-
lysine copolymer is new. The adduct (dsDNA-D-GL) has the
following physico-chemical properties: (i) appearance:
amorphous white powder; (ii) mpt. 263-4°C (dec); (iii)
solubility: soluble in H₂O, 0.01M phosphate buffer, aq. NaCl;
insoluble in MeOH, EtOH, BuOH, Me₂CO, EtOAc, CHCl₃; (iv)
specific rotation: $[\alpha]_D^{25} + 36.67$; (v) acidity: pH 5.8-6.0
(1.2% aq. soln.); (vi) colour reaction: positive to α -naphthol,
diphenylamine, cysteine H₂SO₄, indole, Feulgen's, biuret,
Cl-KI, and Cu-Folin reactions; negative to Lieberman's,
Zimmerman, and FeCl₃ reactions; (vii) elemental analysis:
C 42%, H 6%, N 13%; and (viii) characteristic IR and UV
spectra.

USE/ADVANTAGE

dsDNA-D-GL specifically induces immunological
tolerance for double-stranded DNA (dsDNA) to decrease
dsDNA antibody titre and cell number in dsDNA antibody
production, and is effective in treatment or prevention of

A(10-E, 12-V1) B(4-B4A, 4-C3, 12-A7, 12-D2) 4

179

autoimmune diseases, particularly systemic lupus
erythematoses. dsDNA-D-GL may be administered orally,
subcutaneously or intraperitoneally at a single or in divided
doses as an aq. soln. of 10-50 mg/ml once or several times
a week.

PREPARATION

DNA, commercially available or extracted from animal
tissues, is treated ultrasonically in order to make the size
uniform, and then with nuclease to give dsDNA. dsDNA is
oxidized with NaIO₄ in H₂O or a buffer soln. under cooling or
at room temp. for 1-2 hr. The lysine copolymer (D-GL) in
the same solvent as above is added (excess NaIO₄ is
removed by addition of ethylene glycol) at pH 8-10 under
cooling or at room temp. for 1-12 hr. The product is then
reduced with NaBH₄ to give the adduct, which may be
purified by gel filtration or chromatography using ion
exchange resins.(8ppW52)

J57042632

SP

(1)

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-42632

⑮ Int. Cl.³
A 61 K 37/02
35/24

識別記号

庁内整理番号
7138-4C
7138-4C

⑯ 公開 昭和57年(1982)3月10日

発明の数 3
審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑰ 二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジ
ンコポリマーとの結合物およびその製造法な
らびにこれを含む薬剤

⑱ 特 願 昭55-119313

⑲ 出 願 昭55(1980)8月29日

⑳ 発 明 者 佐々木毅

塩釜市桜ヶ丘8-2

㉑ 出 願 人 佐々木毅

塩釜市桜ヶ丘8-2

㉒ 出 願 人 石田名香雄

仙台市角五郎一丁目5-40

㉓ 代 理 人 弁理士 有賀三幸 外1名

明 細 書

水溶液)

1. 発明の名称

二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジ
ンコポリマーとの結合物およびその製造法な
らびにこれを含む薬剤

2. 特許請求の範囲

1. 次の物性

- (1) 物質の色 無定形白色粉末
- (2) 融解点 263~264℃(分解)
- (3) 溶解性 水、0.01Mリン酸緩衝液、生理食塩水に可溶；メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶
- (4) 比電光率 $[\alpha]_D^{25} = +36.67$
- (5) 電解性・酸性の区別 pH 5.8~6.0 (1.2%)

- (6) 呈色反応 α-ナフトール反応、ジフェニルアミン反応、システイン試薬反応、インドール反応、フョイルゲン反応、ピクレット反応、CG-KI反応、調-フォリン反応は陽性；リーベルマン反応、ジネルマン反応、塩化鉄2液反応は陰性

7) 紫外線吸収スペクトル 第1図

8) 紫外線吸収スペクトル 第2図

- (9) 元素分析組成 C:約42%、H:約6%、N:約13%
を有する二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物、

2. 二本鎖DNAの酸化剤にD-グルタミン酸-

D-リジンコポリマーを反応せしめ、次いでこれを還元することと特徴とする二本鎖 DNA と D-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの重合物の製造法。

3. 次の物性

- (1) 物質の色 不定形白色粉末
- (2) 融点 $263 \sim 264^{\circ}\text{C}$ (分解)
- (3) 溶解性 水、0.01 M リン酸緩衝液、生理食塩水に可溶；メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶
- (4) 比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +38.67$
- (5) 塩基性・酸性の区別 pH 5.8~6.0 (1.2% 水溶液)
- (6) 呈色反応 α -ナフトール反応、ジフェニ

ルアミン反応、システイン反応、インドール反応、フョーレンゲン反応、ピウレット反応、CB-KI 反応、ニ-フォリン反応は陽性；リーベルマン反応、ジメメルマン反応、塩化第 2 候反応は陰性

(7) 赤外線吸収スペクトル 図 1 図

(8) 紫外線吸収スペクトル 図 2 図

(9) 元素分析組成 C: 約 42%、H: 約 6%、N: 約 13% を有する二本鎖 DNA と D-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの重合物を有効成分として含有する薬剤。

3. 発明の即効を説明

本発明は新規な二本鎖 DNA と D-グルタミ

ン酸-D-リジンコポリマーとの重合物およびその製造法ならびにこれを有効成分として含む自己免疫性疾患治療剤に関する。

自己免疫性疾患は、自分自身で自己抗体（自分自身の組織抗原に対して抗体様の活性をもつもの）を産生する疾患であり、自分自身の組織抗原に対して抗体を有するかあるいは抗体を産生するため、自分自身の組織、細胞を自ら破壊するという極めて不合理的な疾患である。そして、自己免疫性疾患には、全身性エリテマトーデス（以下 SLE と略記する）、多発性関節炎、乾燥性眼炎、乾燥性口炎、リウマチ様関節炎、自己免疫性溶血性貧血等がある。

SLE では、自己抗体としてデオキシリボ

酸 (DNA) 抗体、赤血球抗体、リンパ球抗体及びその他の組織抗体が血液中出现し、このリンパ球抗体の出現はリンパ球の減少、赤血球抗体の出現は溶血性貧血等の病態を惹起する。この中で最も問題とされるのは DNA 抗体であり、組織の破壊によつて細胞内から出てきた DNA が血液中で DNA 抗体と結合して DNA-DNA 抗体免疫複合体を形成し、血管炎、腎炎の原因となり、脳障害、肺障害、心臓病等を誘発する。

従来、SLE の治療には、ステロイド剤又はこれとエンドキサン、サイクロホスファミド等の免疫抑制剤との併用が使用されていた。

しかし、これらの薬剤を使用すると、免疫不全、消化器障害、血圧亢進、骨髄抑制、血

慢性大腸炎、急性小腸炎、急性小腸皮膚不全、白血球減少等の副作用を惹起する欠点があつた。

斯る現状において、本発明者は自己免疫性疾患の治療に關し検討を行い、SLEにおいて、DNA抗体の産生を特異的に抑制することができれば、理想的な治療がなされるのではないかと考え、種々研究を行つた結果、二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの複合物が斯る作用を有することを見出し、本発明を完成した。

従つて、本発明の目的は、新規な二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの複合物を提供せんとするものである。

本発明の他の目的は、当該複合物を製造する方法を提供せんとするものである。

室温で1~12時間行うのが好ましい。

次いで、dsDNAの酸化物にD-グルタミン酸-D-リジンコポリマー(以下D-GLと略記する)を反応させる。D-GLは一般に市販されているものを使用でき、これは通常dsDNAの10~30重量倍を使用するのが好ましい。反応は、上記と同じ溶液中、同時に、上記反応液にエナレングリコール等を加えて余分の過ヨウ素酸ナトリウムを除去したものにD-GLを加えて行うのが好ましい。反応液はpH 8~10に保持し、反応は冷却下ないし室温で1~12時間行われる。

更に、斯くして得られる反応物を水酸化ホウ酸ナトリウム等で還元すればdsDNAとD-GLの複合物が得られる。このものは、ゲル

本発明の更に他の目的は、当該複合物を有効成分として含む自己免疫性疾患治療剤を提供せんとするものである。

本発明の二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの複合物は、例えば次のようにして製造される。

まず、市販されているDNAあるいは動物から抽出したDNAを超音波碎機によつて処置してその大きさを揃えた後ヌクレアーゼ処理して二本鎖DNA(以下dsDNAと略記する)を得る。動物細胞DNAは自抗体反応性が少ないので、本発明では、如何なる種類の動物のDNAも使用できる。このdsDNAは過ヨウ素酸ナトリウム等の酸化剤で処置してその酸化物とする。反応は、水又は緩衝液中、冷却下ないし

室温、イオン交換クロマトグラフィーにて行つて未反応のdsDNA、D-GLを除去し、精製することができる。

このようにして得られた本発明の二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの複合物(以下、dsDNA-D-GLと略記する)は次のような物性を有する。

- (1) 物質の色 無定形白色粉末
- (2) 融解点 263~264℃(分解)
- (3) 溶解性 水、0.01Mリン酸緩衝液、生理食塩水に可溶；メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶
- (4) 比電荷量 $[\eta]_{\text{D}}^{25} = +3.667$
- (5) 塩基性・酸性の区別 pH 5.8~6.0 (1.2%ス

溶液)

- (6) 呈色反応 α -ナフトール反応、ジフェニルアミン反応、システイン試薬反応、インドール反応、フオイゲン反応、ピクレット反応、C₆₀-KI 反応、 α -フォリン反応は陽性；リーベルマン反応、ジメメルマン反応、塩化第2鉄反応は陰性

(7) 赤外線吸収スペクトル 第1図

(8) 赤外線吸収スペクトル 第2図

(9) 元素分析組成 C:約42%、H:約6%、N:約13%

本発明の dsDNA - D - GL は、後述の表例 1 に示すごとく、これを動物に投与すると、特異的に dsDNA に対する免疫応答を誘起し、

しながら10分間超音波処理を行つた。これに、0.1 mM 塩化亜鉛含有0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 5 ml、ヌクレアーゼ S (10⁵ 単位/ml) 2.5 ml、蒸留水 17.5 ml を加えて、一本鎖 DNA を分断した後、4℃で24時間 PBS に透析した。これをセファロース 6 B カラムでゲルが過し、各分出分画の OD₂₆₀ を測定すると、void volume の位置に単一のピークが観察される。この部分を蒸め、凍結乾燥して170 mg の dsDNA を得た。

(10) dsDNA - D - GL の製造

(i) で得た dsDNA 10 mg を 1 mg/ml になるように蒸留水に溶解し、攪拌下これに 0.2 M 塩化亜鉛ナトリウム水溶液 10 ml をゆつくりと加える。室温で攪拌しながら1時間反応さ

特開昭57- 42632 (4)

dsDNA 抗体価及び dsDNA 抗体産生細胞数が著しく減少するので、自己免疫性疾患の治療及び予防をすることができる。dsDNA - D - GL は、例えば 10 ~ 50 mg/ml の水溶液とし、週に1回ないしは数回、経口、皮下注射、腹腔内注射等によつて投与するのが好ましく、急性病状悪化時には更に投与量を増すこともできる。

次に実施例を挙げて説明する。

表例例 1

(1) dsDNA の調製

市販仔牛胸腺 DNA 200 mg をリン緩衝液生理食塩水 (以下、PBS と略記する) 100 ml に溶解し、微粉裁口 (Tomy model 150 P) を用いて、150 W で氷冷下、1分毎に停止

せ、反応液にエチレングリコールを 0.006 M になるように加え、室温で10分間反応させて、過剰の過ヨウ素酸ナトリウムを除去する。この溶液に、市販の D - GL (分子量 49,000、D - グルタミン酸 : D - リジン = 60 : 40) 200 mg を 1% 炭酸水素カリウム水溶液 20 ml とかしたものを、dsDNA : D - GL が 1 : 20 (重量) になるように加え、室温で1時間攪拌して反応させる。この間 5% 炭酸カリウムを加えて、反応液の pH を 9.5 に保持する。この反応液に水酸化ホウ素ナトリウムを 1 mg/ml になるように加え、4℃で16時間放置後、透析チューブに入れて、0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液に対して4℃で48時間透析した。これをセファロース 6 B カラムで

ゲルを通し、溶出各成分の dsDNA 濃度を OD₂₆₀ にて、D - GL 濃度を Lowry - Folin 法で測定した。OD₂₆₀ の吸収ピークは void volume の位置に単一のピークを示した。D - GL のピークは 2 本現われ、その 1 本は void volume の位置で、OD₂₆₀ のピークと完全に一致し、他の 1 本はこれよりおくれ出て現れた。OD₂₆₀ のピークに従って分画を採り、乾燥乾燥して 4.6 mg の粉末を得た。

新しく得られた dsDNA - D - GL の dsDNA と D - GL の割合は 1 対 4 であった。またこのものの超遠心分析の結果は第 3 図のとおりであり、単一であった。

実施例 2

dsDNA - D - GL 投与による dsDNA に対す

る抗体の測定：

その結果は第 4 図のとおりであり、dsDNA 抗体価は 14 匹中 11 匹で上昇せずまた、ssDNA 抗体価は 14 匹中 6 匹は上昇しなかった。また、ssDNA 抗体価上昇抑制効果は dsDNA 抗体価上昇抑制より弱く、dsDNA - D - GL は dsDNA 抗体価の上昇を特異的に抑制することがわかる。

(ii) dsDNA - D - GL 投与後の脾臓中の dsDNA 抗体産生細胞数の測定：

dsDNA - D - GL を生理食塩水に溶解し、1.00 μg / ml 溶液を調製する。4 ケ月令の NZB / W F₁ 雌マウスに、先に調製した dsDNA - D - GL 溶液 1 ml を週 1 回ずつ 12 ケ月令まで、腹腔に注射した。対照には同様に生理

食塩水を投与した。

(ii) dsDNA - D - GL 投与後の血中 dsDNA 抗体の測定：

dsDNA - D - GL を生理食塩水に溶解し、1.00 μg / ml 溶液を調製する。4 ケ月令の NZB / W F₁ 雌マウスに、先に調製した dsDNA - D - GL 溶液 1 ml を週 1 回ずつ 12 ケ月令まで、腹腔に注射した。対照には同様に生理食塩水を投与した。12 ケ月令になつた時、採血し、血清中の dsDNA 抗体の力価と一本鎖 DNA (以下、ss-DNA と略記する) 抗体の力価を受身赤血球凝集反応法 (dsDNA 又は ssDNA を凝集させた赤血球の浮遊液に dsDNA 抗体又は ssDNA 抗体を含んだ血清を加えると抗原抗体反応をおこし赤血球が凝集する反応)

生理食塩水を投与した。12 ケ月令になつた時、マウスを殺し、脾臓を取り出し、ステンレス鋼皿の上におき、上から加圧し、脾臓細胞を皿の隅を通加させることにより、脾臓細胞をバラバラにする。この細胞に、dsDNA を凝集させた羊赤血球と、モルモットの抗体を加えた (7.5 抗体測定の時には、さらに IgG 血清を加えた) 後、Cunnigham - Szenberg chamber に封入する。この chamber を 3.7℃ で 1 時間インキュベートすると抗体を産生している細胞のまわりの羊赤血球が凝集し、ブーラックを形成するので、この数を数えて dsDNA 抗体産生細胞数を求めた。

その結果は第 1 表のとおりであり、対照群では、19.0 dsDNA 抗体産生細胞数は 6135

4/100、70 doDNA 抗体産生細胞数は
2928 個/100 細胞であつたが、doDNA-D-
GL 投与群では、それぞれ742 個/100 細胞、
400 個/100 細胞で doDNA-D-GL 投与群で
は、doDNA に対する免疫寛容が認められた。

以下余白

対 照	190 doDNA 抗体産生 細胞数/100 細胞	70 doDNA 抗体産生 細胞数	doDNA-D-GL 投与群 190 doDNA 抗体産生 細胞数/100 細胞	70 doDNA 抗体産生 細胞数
1	6700	0	0	0
2	3000	ND	0	0
3	12000	4800	0	0
4	4600	900	0	0
5	5700	0	0	0
6	3500	2800	0	ND
7	5200	1600	0	ND
8	5000	ND	2600	ND
9	8500	ND	1800	ND
10	8000	ND	0	0
11	9400	10400	2400	0
12	2200	ND	3600	3200
13	5500	ND	100	ND
14	6600	ND	100	ND
平均	61357±2680	2928.6±3705	762.9±1350	400±1131

実験例 3

既に doDNA 抗体を産生している NZB/W
F₁ マウスに対する doDNA-D-GL の治療効
果

一齢 15 匹の 7 ヶ月令の NZB/W F₁ マウ
ス（既に doDNA 抗体を産生しているもの）に、4
doDNA-D-GL 100 ㎍/㎖ 生理食塩水 1
㎖ を、内 1 回 12 ヶ月令まで腹腔に投与し、
12 ヶ月令での生存数を調査した。対照群に
は、同マウス 21 匹を投与し、生理食塩水を
投与した。

その研究は表 2 表のとおりであり、doDNA
-D-GL の投与により自己免疫性疾患を治
療できることがわかる。

表 2 投

対 照	生存数/投与数(匹)	生存率 (%)
doDNA-D-GL 投与群	14/21	66.7
	15/15	100

図面の図号を説明

図 1 図は本発明の二本鎖 DNA と D-グルタ
ミン酸-D-リジノコポリマーとの融合物の
紫外線吸収スペクトル、図 2 図は同融合物の
紫外線吸収スペクトル、図 3 図は同融合物の
同融合物分析の結果、図 4 図は同融合物の投与
による一本鎖 DNA 抗体及び二本鎖 DNA 抗体
の抗体面上昇抑制効果を示す。

以 上

特開昭57-42632(7)



